
COMPARACIÓN ENTRE DIFERENTES TÉCNICAS DE ESTUDIO DEL GANGLIO CENTINELA DESPUÉS DE NEOADYUVANCIA EN CÁNCER DE MAMA

A COMPARISON BETWEEN DIFFERENT SENTINEL NODE DETECTION TECHNIQUES AFTER NEOADJUVANCY IN BREAST CANCER

Luz Fernanda Sua Villegas¹, Virginia de la Orden García², Sara Rafael Fernández², Silvia Veganzones de Castro², Marta Vidaurreta Lázaro², M^a Luisa Maestro de las Casas², José M. Román³

RESUMEN

Introducción. El papel de la biopsia del ganglio centinela realizada después de quimioterapia neoadyuvante es controvertido. El objetivo del presente estudio es analizar el valor del ganglio centinela en los tumores de mama avanzados que han recibido neoadyuvancia y estudiarlos con técnicas de hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica y molecular de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). **Material y métodos.** Un total de 33 pacientes fueron incluidas en el estudio; estas enfermas recibieron neoadyuvancia y se les realizó la técnica del ganglio centinela. Una vez extraído el ganglio, éste era enviado a anatomía

patológica, donde era evaluado y posteriormente se fragmentaba, utilizando entre un 25% y 50% del ganglio para el estudio en el laboratorio de biología molecular. **Resultados.** Los ganglios centinelas se estudiaron con las técnicas de hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica y la molecular, encontrando un incremento de la sensibilidad con la última técnica, la del RT-PCR. Los ganglios centinelas fueron negativos en un 45.1% y las linfadenectomías fueron negativas en un 61.3% después de neoadyuvancia. Las recidivas locales a 5 años equivalen al 8.3%. Para nuestra serie la tasa de supervivencia libre de enfermedad a 5 años en estadio II es del 100% y en estadio III es del 87.5%. **Conclusión.** Existe un escaso número de pacientes estudiadas, sin

¹ MD, Departamento de Anatomía Patológica y Patología Clínica. Universidad del Valle. Cali, Colombia.

² Servicio de Análisis Clínicos, Laboratorio de Genómica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid, España.

³ MD, Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, España.

un seguimiento que avale el uso de la biopsia del ganglio centinela después de neoadyuvancia, por lo que actualmente sólo debiera realizarse con fines de investigación. Al comparar las técnicas de hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica y molecular, comprobamos mayor sensibilidad en la técnica molecular, lo cual permite disminuir los falsos negativos y tener un mejor diagnóstico de las metástasis en los ganglios centinela.

Palabra clave: Técnica del ganglio centinela, carcinoma de mama avanzado, estudio molecular RT-PCR.

ABSTRACT

Introduction. Since the role of sentinel node biopsy after neoadjuvant chemotherapy is controversial, the aim of our study was to analyze the value of sentinel node detection in advanced breast tumors that received neoadjuvant therapy. Technical study was done with hematoxylin/eosin stain, immunohistochemistry and molecular polymerase chain reaction (RT-PCR). **Material and methods:** We studied 33 patients who received neoadjuvant therapy and underwent sentinel node procedure. After removing the node, it was sent to pathology where it was evaluated; further fragments, using between 25% and 50% of the lymph node, were used for analysis at the molecular biology laboratory. **Results:** The sentinel nodes were studied with hematoxylin and eosin, immunohistochemistry and molecular techniques, finding an increase in sensitivity with RT-PCR. They were negative in 45.1% and lymphadenectomy tissue was negative in 61.3% after neoadjuvant therapy. Local recurrences at 5 years are equivalent to 8.3%. For our series the rate of disease-free survival at 5 years in stage II is 100% and stage III is 87.5%. **Conclusion.** Sentinel node biopsy after neoadjuvant therapy for breast cancer should only be a matter of research, since

the number of studied patients is small and there have been no monitoring to endorse a wide use of the procedure. When comparing hematoxylin/eosin, immunohistochemistry and molecular techniques, increased sensitivity was found with the molecular one; RT-PCR can reduce false negative reports and furnish a better diagnosis of sentinel node metastases.

Key words: Sentinel node technique, advanced breast cancer, molecular study RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

Se considera como ganglio centinela (GC) el primer ganglio que recibe el drenaje linfático de una región anatómica determinada. La detección de GC negativo a metástasis en el cáncer de mama sirve para identificar a las pacientes que se beneficiarán con la disección ganglionar axilar; por otro lado permite adecuada estadificación, sin necesidad de efectuar una linfadenectomías completa con el consiguiente beneficio en términos de menor morbilidad. (1)

Sabemos que la linfadenectomía rutinaria en etapas iniciales de cáncer de mama sin ganglios axilares palpables genera morbilidad hasta en 40% de los casos (2), sobre todo linfedema agudo y crónico (3) y lesiones nerviosas, con aparición de parestesias y a veces afectación del paquete vasculonervioso del gran dorsal y es probablemente un procedimiento innecesario en alrededor del 60% de las pacientes (4-5). En contraste, en los tumores de mama avanzados la realización de las linfadenectomías permite hacer una estadificación adecuada, además de ser un factor pronóstico e indicador de tratamiento.

Ante la falta de estudios prospectivos y aleatorizados sobre distintos aspectos de la técnica del

ganglio centinela, y debido a su amplia difusión y aplicación, ha sido necesario precisar una serie de criterios de indicación, aspectos técnicos específicos y un proceso de validación, que se han redactado tanto en las recomendaciones de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) (6) como en la Conferencia Internacional de Consenso de Saint Gallen (7).

Pese a los avances logrados, en el Instituto Oncológico Europeo de Milán (IEO) se enfatiza que en cuanto al ganglio centinela aún falta mucho por determinar. Existen todavía muchas situaciones en las que tendrá que comprobarse si el ganglio centinela es útil. Lo que sí es verdad es que en la lista inicial de potenciales aplicaciones, cada vez hay más pacientes que dejan de estar en la columna de las contraindicaciones. (8)

La exploración intraoperatoria del ganglio centinela con métodos de anatomía patológica convencional (hematoxilina y eosina) se presentó como resultado de un desarrollo continuo del análisis del ganglio centinela y fue diseñada para aumentar los beneficios de la paciente, convirtiendo a la cirugía de un paso en una posibilidad real. Estos métodos intraoperatorios como la citología por impronta o corte por congelación, suelen carecer de cierta falta de sensibilidad y no están estandarizados, lo que produce un número considerable de falsos negativos, de modo que un número significativo de metástasis solo se detectan más tarde mediante la inmunohistoquímica. El método molecular de RT-PCR nos permite analizar todo el ganglio linfático y tomar una decisión final en el marco temporal de la intervención quirúrgica. (9)

Con este estudio prospectivo estudiamos las pacientes con carcinoma de mama avanzado que recibieron neoadyuvancia, se les realizó mastectomía radical modificada o cuadrantectomía más va-

ciamiento ganglionar y técnica del ganglio centinela. Los ganglios centinels fueron evaluados durante el acto intraoperatorio con hematoxilina y eosina (H&E), realizando improntas citológicas y/o biopsia por congelación, también se les realizó la técnica de inmunohistoquímica (IHC) para citoqueratina AE1-AE3 según los protocolos establecidos. Con estas condiciones se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) en busca de metástasis.

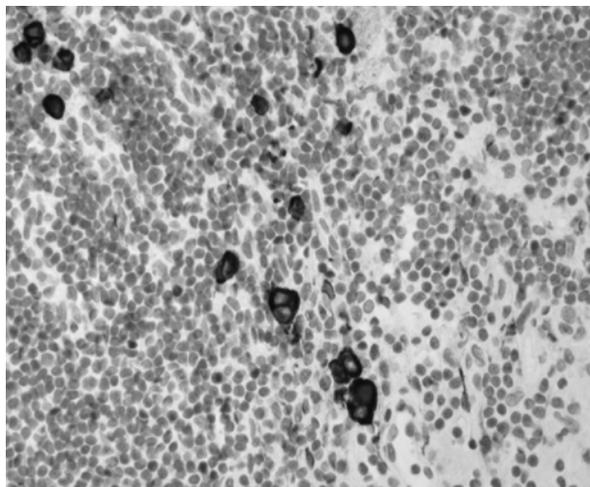
PACIENTES Y MÉTODO

Se estudiaron 31 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama invasor. La clasificación de las pacientes se basó en el sistema TNM. El periodo de estudio fue de mayo del 2005 a mayo del 2010. Estas pacientes recibieron cirugía radical con buena migración del marcador durante la determinación del ganglio centinela. Este estudio fue validado por el comité de ética e investigación clínica del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, España (HCSC) y aprobado por el Departamento de Anatomía Patológica y Patología Clínica de la Universidad del Valle, en Cali, Colombia (UV).

Anatomía Patológica: Una vez los ganglios centinels eran recibidos en el laboratorio de Anatomía Patológica se prepararon según los procedimientos estándares. Cada ganglio linfático se cortaba en dos o más partes entre 1.5 y 3mm. Los fragmentos del ganglio centinela elegidos para RT-PCR no podían haber sido usados en la biopsia por congelación. Este ganglio era distribuido según el tamaño: un 50% a 75% para Anatomía Patológica y entre un 25% a 50% para la técnica molecular, transportado en solución de guanidina (RNA STAT-60) al laboratorio de biología molecular. El fragmento o fragmentos del ganglio centinela fueron fijados con formalina y posteriormente incluidos en bloques de parafina. Una vez en estos

bloques, se realizaron un mínimo de 6 niveles por bloque para coloración de H&E y otros seis niveles para realizar el estudio de IHC para citoqueratina AE1-AE3 según los protocolos. (Figura 1)

Figura 1. Se identifican células tumorales epiteliales, inmuno-reactivas a CKAE1-AE3.



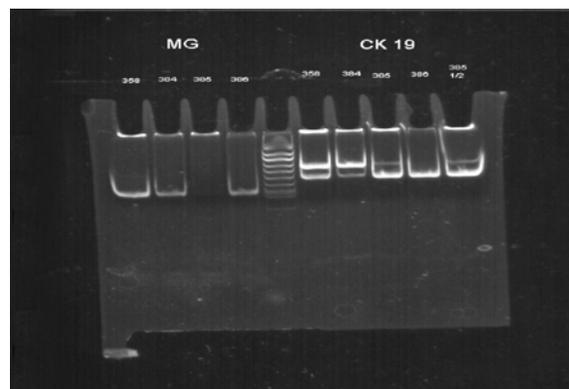
Las mamas estudiadas fueron revisadas por dos patólogos independientes (HCSC y UV) e incluían variables como: tamaño del tumor, tipo histológico, presencia o ausencia del componente intraductal, porcentaje sobre el total del tumor, grado histológico y nuclear, estado de los márgenes, estado de la piel y músculos profundos, invasión vascular y neural, número de ganglios linfáticos de la linfadenectomía, técnica de IHC, receptores hormonales, Ki67 y HER-2neu.

Molecular: La extracción del RNA de cada una de las muestras se realizó siguiendo las indicaciones del Rneasy Mini Kit (Qiagen). Un volumen de etanol al 70% era añadido al tejido y posteriormente homogeneizado por medios mecánicos. La mezcla es añadida a una columna para centrifugar a 8.000 g durante 30 segundos. El RNA queda adherido a la membrana de la columna y es eluido en 50 µl de agua libre de RNasas. La integridad del RNA se comprobó en gel de agarosa en condiciones

desnaturalizantes al 1%. Solo las muestras que presentaban las bandas 28S y 18S del RNA ribosómico eran usadas en las técnicas de RT-PCR. Para la determinación de mamoglobina y CK-19 se emplearon 5 µl de RNA.

Los primers empleados en la RT-PCR fueron: Sense 5'CAA ACG GAT GAA ACT CTG AGC AAT GTT GA y AntiSense 5'TCT GTG AGC CAA AGG TCT TGC AGA en el caso de la mamoglobina A y Sense: 5'AGA TGA GCA GGT CCG AGG TTA y AntiSense 5' CCT GAT TCT GCC GCT CAC TAT CA en la determinación de la CK-19 (10). En la amplificación se empleó una concentración final de 400 µM de dNTP y 0.6µM de cada uno de los primers. Se realizó la retrotranscripción y la amplificación en una sola reacción. El análisis de los productos amplificados se realizó en un gel de poliacrilamida al 12 %.(Figura 2)

Figura 2. Amplificación de la CK 19 y Mamoglobina A.



RESULTADOS

El promedio de edad de las pacientes variaba desde 34 hasta 87 años, con una media de 60.5 años. El 9.6% (3 pacientes) tenían historia familiar de cáncer de mama y cinco (16%) tenían historia familiar de otro tumor. El 9.6% de las pacientes ya habían padecido de cáncer de mama. El tamaño del tumor fue de 2.1 a 3 cm en un 38.7% (12 pacien-

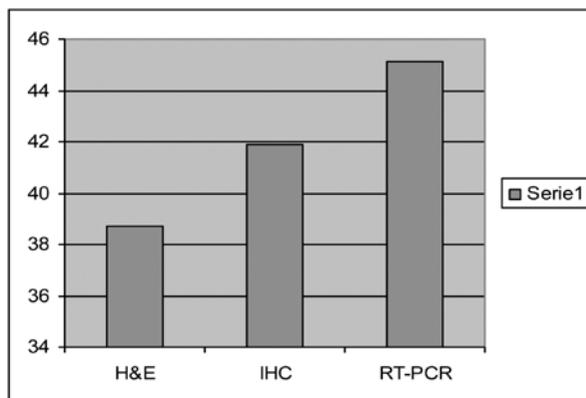
tes), de 5.1 a 10 cm en un 29% (9 pacientes), en 6 pacientes el tumor media menos de 2 cm (19.3%) y de 3.1 hasta 5 cm en el 13% (4 pacientes). El 45.1% (14 pacientes) se encontraban en estadio IIA con compromiso ganglionar, 6 pacientes (19.3%) estaban en estadio IIB, el 19.3% (6 pacientes) en estadio IIIB, 4 pacientes (13%) estadios IIIA y una paciente (3.2%) IIIC al momento de ser diagnosticadas.

El 100% de las pacientes recibió neoadyuvancia según protocolos estándares. El promedio de ganglios centinela extraídos fue en un 48.3% (1 ganglio linfático), 28.1% (2 ganglios linfáticos), 16.1% (3 ganglios linfáticos), 3.2% (4 ganglios linfáticos) y 3.2% (5 ganglios linfáticos).

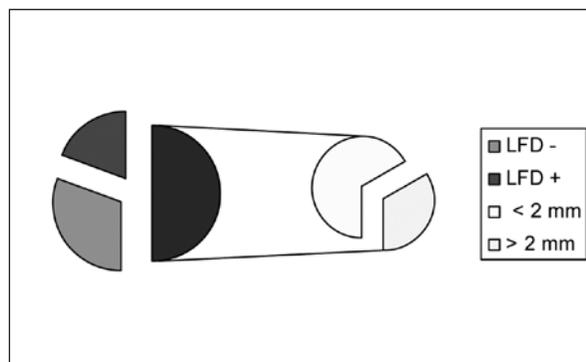
El estudio del ganglio centinela determinó positividad con H&E de un 38.7% (12 pacientes), por IHC de 41.9% (13 pacientes) y por RT-PCR de 45.1% (14 pacientes) (**Gráfica I**). Encontrando micrometástasis (menores de 0.2 a 2 mm) en 8 pacientes (61.5%), mayores de 2 mm en 4 pacientes (30.7%), una determinación (7.7%) de células tumorales aisladas (menor de 0.2mm) por IHC y una más por RT-PCR correspondiente al 7.7%.

Al examinar las linfadenectomías se extrajeron en el 45.1% (14 pacientes) de 10 a 15 ganglios linfáticos, en el 25.8% (8 pacientes) 9 ganglios linfáticos, en 6 pacientes (19.3%) de 16 a 20 ganglios linfáticos y en el 9.6% (3 pacientes) más de 20 ganglios linfáticos. La positividad en las linfadenectomías evaluadas con H&E determinó 12 de ellas (38.7%) con compromiso ganglionar, de estas, 8 presentaban micrometástasis (66.6%) y 4 (33.3%) compromiso mayor de 2 mm. Siete pacientes tenían compromiso de un ganglio linfático (58.3%), tres pacientes compromiso de 2 ganglios linfáticos (16.6%), una paciente 3 ganglios linfáticos (8.3%) y una paciente 11 ganglios linfáticos comprometidos en la linfadenectomía (8.3%). (**Gráfica II**)

Gráfica I. Determinación de metástasis en los ganglios centinela por hematoxilina y eosina, inmunohistoquímica y reacción en cadena de la polimerasa RT-PCR.



Gráfica II. Linfadenectomías negativas (LFD-) y positivas (LFD+). Tamaño de las metástasis encontradas en las de pacientes con cáncer de mama avanzado y tratamiento neoadyuvante.



Dentro del grupo de las pacientes negativas para el ganglio centinela encontramos 17 pacientes (54.8%) con dos linfadenectomías positivas correspondiente al 11.7%. La variedad histológica determinada fue 24 pacientes tipo carcinoma ductal infiltrante (77.4%), 6 pacientes tipo carcinoma lobulillar infiltrante (19.3%) y un caso de carcinoma metaplásico atípico (3.2%). El grado histológico predominante fue de alto grado (grado III) en 16 pacientes (51.6%) y moderadamente diferenciado (grado II) en 15 pacientes (48.3%).

Estudios de receptores estrogénicos mostraron 17 pacientes positivas (54.8%) y 19 pacientes negativas para progesterona (61.2%), el Ki67 en 21 pacientes (67.7%) se determinó entre un 10 y 50% de proliferación, el oncogen Her2neu fue positivo en 10 pacientes (32.2%). Nueve pacientes evaluadas de la serie fueron determinadas como triple negativa (29%).

El 100% de las pacientes recibió tratamiento postquirúrgico, de estas pacientes 7 han recidivado en un lapso de tiempo que varía entre 15 y 36 meses. Se encontró recidiva local en un 28.5% (2 pacientes) y en tejido óseo 2 pacientes (28.5%), seguido de pulmón, cerebro e hígado, cada uno con un 14.2% de frecuencia y correspondiente a una paciente respectivamente.

Fallecieron 3 pacientes (9.6%), las cuales recidivaron en un lapso de 24 a 31 meses, 1 con recidiva local, 1 en cerebro y 1 pulmón. Dos pacientes fallecieron por causa del cáncer de mama y una por problemas cardiovasculares. El tiempo del diagnóstico de la recidiva a la muerte varió entre 2 y 5 meses.

El periodo de seguimiento a 5 años corresponde a 12 pacientes (38.7%), con 3 recidivas (25%) y una muerte a causa del tumor (8.3%). Por 4 años se han seguido 8 pacientes (25.8%), con tres recidivas (37.5%) y dos muertes, una por causa tumoral (12.5%) y no tumoral (12.5%). Seis pacientes (19.3%) se han seguido por 3 años, con presencia de una recidiva ósea (16.6%). Tres pacientes (9.6%) se han seguido por un año y 2 pacientes se han seguido por 5 meses (6.4%) sin recidiva tumoral.

DISCUSIÓN

En nuestra serie el compromiso axilar se observa relacionado directamente con edades mayores, me-

dia de 60.5 años, con tipos histológicos de alto grado (51.6%) y con el tamaño tumoral mayor de 2.1 a 10 cm en un 80.7%. Esto es similar a lo publicado por Silverstein M en una revisión de 330 publicaciones (Up to date 2004), donde la magnitud del riesgo depende del grado histológico, tamaño y edad.

La probabilidad de no tener metástasis axilares en el cáncer de mama localmente avanzado es de alrededor del 25%. En nuestra serie encontramos compromiso axilar en el 80.6% de los carcinomas avanzados en el momento del diagnóstico clínico o por punción guiada por ecografía.

Al observar los ganglios centinelas de las pacientes con tumores avanzados posterior a la neoadyuvancia, vemos que la presencia de positividad ganglionar en el total de la serie fue de un 45.1%, determinado por RT-PCR, la técnica con mayor sensibilidad de las tres estudiadas. En el estudio de MD Anderson entre un 25% a 33% de las linfadenectomías axilares se hacían completamente negativas post-quimioterapias neoadyuvantes. Nosotros encontramos negatividad del 61.3% en las linfadenectomías. En una revisión Cochrane de 2007 sobre quimioterapia preoperatoria en mujeres con cáncer de mama operable, analizando los resultados de 14 estudios que agrupaban a un total de 5500 mujeres, se observó que la tasa de respuesta patológica completa (RpC) osciló entre 4,0% y 29,2%. con quimioterapia preoperatoria. (11)

Nuestra tasa de falsos negativos utilizando la H&E, IHC y RT-PCR es de cero, gracias al incremento de la sensibilidad por la técnica molecular. En una revisión de 11 estudios la tasa de falsos negativos fluctuó entre 0 y 33%. (12-13).

La efectividad de la biopsia del ganglio centinela no ha sido probada en cáncer de mama avanzado porque aparentemente la quimioterapia no podría

tener un efecto uniforme sobre las metástasis, pudiendo causar desaparición de algunas y no de otras, por lo tanto puede existir la posibilidad de quedar enfermedad residual con ganglio centinela negativo (14). En nuestro estudio no es coincidente la negatividad del ganglio centinela con la cadena ganglionar en un 11.7%.

En síntesis, existe escaso número de pacientes estudiadas y no hay seguimiento de tales pacientes que avale el uso de la biopsia del ganglio centinela después de neoadyuvancia y por el momento debiera solo realizarse con fines de investigación.

Las recidivas locales a 5 años oscilan entre 4 a 10%; en nuestra serie la recidiva local en 5 años equivale al 8.3%. Las tasas de sobrevida en estadios II se encuentran entre 60-75% y estadio III de 30-45%. Para nuestra serie la tasa de sobrevida libre de enfermedad a 5 años en estadio II es del 100% y en estadio III es del 87.5% al realizar tratamiento neoadyuvante, tumorectomía, linfadenectomías axilar completa y tratamiento posquirúrgico estandarizado (15). Así mismo, en la revisión Cochrane del 2007, se comparó la supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad entre las mujeres con RpC y las mujeres que tenían enfermedad residual en el examen patológico. En ambos aspectos los datos son significativamente superiores en pacientes con RpC. En esta revisión se enfatiza la importancia de incorporar la cirugía en el régimen de tratamiento locorregional después de la administración de quimioterapia preoperatoria, incluso cuando el tratamiento sistémico neoadyuvante haya derivado en la completa desaparición del tumor, ya que se demuestra que la cirugía conservadora de la mama después de la quimioterapia preoperatoria, se acompaña de disminución de las tasas de recidiva locorregional, si bien no se aprecia ningún aumento en la supervivencia general y libre de enfermedad, aunque el período de seguimiento de estos ensa-

yos de cáncer de mama de estadio inicial todavía pueden ser demasiado limitados para identificar las diferencias en la supervivencia.

CONCLUSIONES

El número de pacientes estudiadas con biopsia del ganglio centinela después de neoadyuvancia es escaso y además no ha habido seguimiento de tales pacientes para avalar el uso del procedimiento; por esto, dicha biopsia ganglionar debiera sólo realizarse con fines de investigación.

Al comparar la sensibilidad de los métodos de detección de metástasis ganglionares con la H&E, IHC y RT-PCR, comprobamos que la técnica molecular es la más sensible y está protocolizada; con los avances actuales está siendo aplicada con el nombre de técnica OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) y es utilizada en la práctica diaria.

El tratamiento neoadyuvante, la tumorectomía, la linfadenectomía y el tratamiento postquirúrgico son fundamentales para incrementar la sobrevida y el tiempo libre de enfermedad en el cáncer de mama avanzado.

REFERENCIAS

1. Piñero A, Giménez J, Merck B, Vázquez C y Grupo de Expertos. Reunión de consenso sobre la biopsia selectiva del ganglio centinela en el cáncer de mama. *Rev Esp Patol* 2007; 40(2): 91-95.
2. Wartmuth MA, Bowen G, Prosnitz LR, Chu L, Broadwater G, Peterson B et al Complications of axillary lymph node dissection for carcinoma of the breast. *Cancer* 1998; 83: 1362-1368.
3. Kissin MW, Quercy Della Rovere G, Easton D, and Westbury G. Risk of lymphoedema following the treatment of breast cancer. *Br J Surg* 1986; 73:5804.
4. Bass SS, Cox CE, Ku NN, Berman C, Reintgen D. The role of sentinel lymph node biopsy in breast cancer. 1999; 189:183-194.
5. Siegel BM, Mayzel KA, Love SM. Level I and II axillary dissection in the treatment of early-stage Breast

- cancer. An analysis of 259 consecutive patients. Arch Surg 1990; 125: 1144-7.
6. Lyman GH. ASCO Guideline Recommendations for Sentinel Lymph Node Biopsy in Early-Stage Breast Cancer J Clin Oncol 2005; 23:7703-20.
 7. Senn HJ, Thurlimann B, Goldhirsch A et al: Comments on the St. Gallen Consensus 2003 on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. Breast 12: 569-582, 2003.
 8. Mucientes R., Farge B., Cardona A., Moreno E., Delgado-Bolton R., Izarduy P., Rodriguez R., Lapena G., Gonzalez M., Roman S., Carreras D. SPECTTAC: una nueva herramienta para la localización del ganglio centinela en pacientes con cáncer de mama, Rev Esp Med Nucl. 2008 May-Jun; 27(3):183.
 9. E Bernet, Avances y perspectivas futuras del ganglio centinela. En: XIII Curso de Actualización en Obstetricia y Ginecología, 2009. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.
 10. Backus J, Laughlin T, Wang Y et al. Identification and characterization of optimal gene expresi3n markers for detection of breast cancer metastasis. J Mol Diagn 2005; 7:327-336.
 11. Mieog JSD, van der Hage JA, van de Velde CJH. Quimioterapia preoperatoria para mujeres con c3ncer de mama operable (Revisi3n Cochrane). En: La Biblioteca Cochrane Plus, 2007 N3mero 4. Oxford: Update Software Ltd. Disponible en: <http://www.update-software.com>.
 12. Nason KS Anderson BO, Byrd Dr et al. Increased false negative sentinel lymph node biopsy rates after preoperative chemotherapy for invasive breast cancer. Cancer 89: 2187-2194, 2000.
 13. Kuerer H, Newman L. Lymphatic mapping and sentinel lymph node biopsy for breast cancer: Development and resolving controversies. J. Clin Oncol 23: 1698-1705, 2005.
 14. Noguchi M. Current controversies concerning sentinel lymph node biopsy for breast cancer. Review. Breast cancer Research and treatment 84: 261-271, 2004
 15. Apantaku LM. Breast cancer diagnosis and screening. [Internet]. American Family Physician; 2000 [acceso 28/6/2007].

Recibido para evaluaci3n: 20 de octubre de 2010
Aceptado para publicaci3n: 17 de diciembre de 2010

Correspondencia:
Luz Fernanda Sua Villegas
lufer24@hotmail.com